



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年12月25日

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-392167

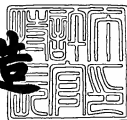
出 願 人
Applicant(s):

大阪大学長

2001年 5月31日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3049837

【書類名】	特許願
【整理番号】	U2000P124
【提出日】	平成12年12月25日
【あて先】	特許庁長官 及川 耕造 殿
【国際特許分類】	C12N 15/00
【発明の名称】	外来物質の導入方法
【請求項の数】	18
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府豊中市上野坂 1 - 1 0 - 2 2
【氏名】	小林 昭雄
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府大阪市阿倍野区晴明通 2 番 2 1 タウンハウス晴明 3 A
【氏名】	福井 希一
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府高槻市上土室 3 - 2 9 - 2
【氏名】	原島 俊
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府吹田市佐竹台 4 - 4 - 2
【氏名】	福崎 英一郎
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府高槻市日吉台四番町 1 9 - 1 2
【氏名】	梶山 慎一郎
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府茨木市下中条町 1 - 4 清風荘 1 2 号
【氏名】	奥田 伸哉
【発明者】	
【住所又は居所】	大阪府大阪市淀川区宮原 1 - 1 9 - 2 3 - 1 1 0 8
【氏名】	庄司 猛

【特許出願人】

【識別番号】 391016945

【氏名又は名称】 大阪大学長 岸本 忠三

【代理人】

【識別番号】 100072051

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】 100059258

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 暁秀

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9709713

【書類名】 明細書

【発明の名称】 外来物質の導入方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生細胞の細胞表面の一部に外来物質を担持した小粒子を置き、該細胞表面の一部にレーザー光を照射し加工することにより細胞壁及び／又は細胞膜に穿孔を設けると同時に外来物質を前記生細胞内へ導入することを特徴とする外来物質の導入方法。

【請求項 2】 生細胞が植物細胞であり、前記植物細胞の細胞壁の少なくとも一部が除去され細胞膜が露出していることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 細胞壁の除去を、レーザー光を照射することにより行う請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】 小粒子が、粒径 $0.01\mu\text{m}$ ～ $10\mu\text{m}$ の微粒子である請求項 1 ～ 3 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】 小粒子が、外来物質を包括したリボソームであることを特徴とする請求項 1 ～ 4 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】 小粒子が、外来物質を固定化したビーズであることを特徴とする請求項 1 ～ 4 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】 外来物質の固定化を、硬化原料を水中に有している油中水型エマルジョンに、少なくとも外来物質及び硬化剤を含む水溶液を添加し、硬化反応物を形成することにより行うことを特徴とする請求項 6 項に記載の方法。

【請求項 8】 前記硬化原料が、アルギン酸ナトリウムであり、前記硬化剤が塩化カルシウムであり、前記硬化反応物がアルギン酸カルシウムである請求項 7 項に記載の方法。

【請求項 9】 レーザーが、YAG レーザー、エキシマレーザー、Ar イオンレーザー、窒素レーザー、窒素励起色素レーザーからなる群から選択される少なくとも 1 種であることを特徴とする請求項 1 ～ 8 項に記載の方法。

【請求項 10】 外来物質が、遺伝物質、タンパク質、オルガネラ、生理活性物質、指示薬からなる群から選択される少なくとも 1 種である請求項 1 ～ 9 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1】 遺伝物質が、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、プラスミド、染色体、人工染色体、オルガネラDNA、核酸アナログからなる群から選択される少なくとも1種である請求項 1 0 記載の方法。

【請求項 1 2】 生細胞にレーザー光を照射し、該生細胞の細胞壁及び／又は細胞膜の一部を除去し、該照射部位からマイクロインジェクターを用いて該生細胞内へ外来物質を導入することを特徴とする外来物質の導入方法。

【請求項 1 3】 生細胞にレーザー光を照射し、該生細胞の細胞壁の一部を除去し、細胞膜の一部を露出させた後、該露出細胞膜上に外来物質を包括したリポソームを置き、該露出細胞膜とリポソームを融合させることにより生細胞内へ外来物質を導入することを特徴とする外来物質の導入方法。

【請求項 1 4】 外来物質が、遺伝物質、タンパク質、オルガネラ、生理活性物質、指示薬からなる群から選択される少なくとも1種である請求項 1 2 又は 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】 遺伝物質が、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、プラスミド、染色体、人工染色体、オルガネラDNA、及び核酸アナログからなる群から選択される少なくとも1種である請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】 植物生体組織中の1個又は複数個の細胞にレーザー光を照射し、当該細胞の細胞壁の一部を除去した後、該植物生体組織を加水分解酵素で処理し、該植物生体組織のレーザー照射部位周辺のみの細胞壁を選択的に除去し、スフェロプラスト化又はプロトプラスト化する方法。

【請求項 1 7】 植物生体組織が、葉、根、茎、莖根、根端、胚細胞、種子、花粉、カルス、懸濁細胞、不定胚、及び毛状根からなる群から選択される少なくとも1種である請求項 1 6 記載の方法。

【請求項 1 8】 請求項 1 1 又は 1 5 項に記載の方法を用いて生細胞内へ遺伝物質を導入した、形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【産業の利用分野】

本発明は、外来物質の導入方法に関し、特にレーザーを用いて生細胞に外来物

質を導入する外来物質の導入方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子等の外来物質を生細胞に導入する方法としては、大別して直接微細なガラス管を用いて注入する方法(マイクロインジェクション法)、細胞融合の技術を応用する方法(リボソーム法やプロトプラスト融合法)、感染の過程を利用した導入法(アグロバクテリウム法)、及び膜透過性を亢進させる方法(エレクトロポレーション法)などが知られている。

【0003】

マイクロインジェクション法は、ガラス管を用いて微細なマイクロピペットをつくり、それにマイクロマニピュレータをつないで顕微鏡下で1つ1つの細胞に外来物質液を注入していく方法である。この方法は、細胞壁を持たない動物細胞に対して比較的優れた外来物質導入法である。

【0004】

細胞融合の技術を応用する方法としては、プロトプラスト融合法及びリボソーム融合法などがある。プロトプラスト融合法は、クローン化したプラスミドを持った大腸菌等をプロトプラストにして、目的の細胞とポリエチレングリコール等で融合させることにより遺伝子を導入する方法である。リボソーム融合法は、リボソームを担体として目的の細胞に外来物質を導入する方法である。

【0005】

感染などの過程を利用した導入法としては、Tiプラスミドを運ぶアグロバクテリウムを利用した遺伝子導入法が知られている。

【0006】

膜透過性を亢進させるエレクトロポレーション法は、細胞を外来物質溶液中に溶解または懸濁して直流高電圧のパルスをかけると、細胞内に外来物質が導入されることを利用する方法である。

【0007】

また、DNAでコーティングした金属微粒子を高速で、生物の細胞に打ち込み、細胞壁、細胞膜を貫通して、細胞内に遺伝子を導入する遺伝子銃法も知られて

おり、さらに最近では、レーザーを用いた外来物質の導入法が知られている。これら従来の外来物質細胞内導入法は、主に外来遺伝子を導入して標的細胞の形質転換を行う目的で使用されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、近年、バイオテクノロジーの進歩に伴い、葉緑体、核、染色体、ミトコンドリアなどのオルガネラ、生理活性物質や指示薬、あるいは機能性タンパク質といった遺伝子以外の外来物質の生細胞への導入により、疾病の診断や治療、各種耐性を付与した農作物の分子育種、家畜を含む有用作物の生産等の可能性が出てきている。さらに、生体組織中の特定細胞に外来物質を導入することにより、例えば植物の場合には、脱分化・再分化を経ないダイレクトな形質転換体の作製も考えられ、脱分化・再分化系が確立されていない多くの有用植物の分子育種も期待されている。また、複数種類の外来物質を同時に細胞内へ導入することにより、複数の形質を同時に転換した形質転換作物の作成も期待されている。

【0009】

このような観点からすると、従来の外来物質導入法のうち、Tiプラスミドを運ぶアグロバクテリウムを利用した遺伝子導入法、プロトプラスト融合法および、遺伝子銃法は、遺伝子以外の外来物質を導入することが困難であるという問題点を有する。また、マイクロインジェクション法、リボソーム融合法、エレクトロポレーション法は、遺伝子以外の外来物質導入を行える可能性を有するが、エレクトロポレーション法と、リボソーム融合法は、植物細胞に適応する場合、プロトプラスト化する必要があるため、特定の組織の特定の1細胞に外来物質を導入することは困難であるという問題点を有する。マイクロインジェクション法は、動物細胞よりも堅固な細胞壁を有する植物細胞について操作するには熟練を要求され困難を極めるという問題点を有している。さらにレーザーを用いた遺伝子導入法は、特定の標的細胞に外来物質を導入可能であるが、従来のレーザー法では、人工染色体などの物理的強度が著しく低い外来物質や、オルガネラなどの巨大構造体を安定的に細胞内に導入することが困難であるという問題点を有する。

【0010】

したがって、操作が容易で、汎用性を有し、さらには、特定の1細胞を標的細胞として形質転換させることが可能で、かつ、生物種を選ばずに、生細胞に遺伝子のみならず、人工染色体などの物理的強度が著しく低い外来物質や、オルガネラなどの巨大構造体等の外来物質を導入できる方法の開発が望まれていた。しかしながら、このような生細胞への物質の導入法は、これまで知られていない。

【0011】

そこで、本発明の目的は、レーザー光の持つ高い加工特性を利用して、植物細胞壁を構成する生体高分子の化学結合を切断し、外来物質を導入する方法を提供するものである。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために研究した結果、レーザー光の持つ高い加工特性を用いて生細胞、特に植物細胞壁などの堅固な細胞壁に対しても穿孔を設けることができることに着目し、本発明を達成するに至った。

【0013】

即ち、本発明の外来物質の導入方法は、生細胞の細胞表面の一部に外来物質を担持した小粒子を置き、該細胞表面の一部にレーザー光を照射することにより細胞壁及び/または膜に穿孔を設け、該穿孔を通じて外来物質を前記生細胞内へ導入することを特徴とする。

【0014】

また、本発明の外来物質の導入方法の好ましい実施態様において、生細胞が植物細胞であり、前記植物細胞の細胞壁の少なくとも一部が除去されていることを特徴とする。

【0015】

また、本発明の外来物質の導入方法の好ましい実施態様において、細胞壁の除去を、レーザー光を照射することまたは、レーザー光を照射と加水分解酵素処理の組み合わせることにより行うことを特徴とする。

【0016】

また、本発明の外来物質の導入方法の好ましい態様としては、小粒子が、粒径 $0.01\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ の微粒子であることを特徴とする。

【0017】

また、本発明の外来物質の導入方法の好ましい態様としては、小粒子が、外来物質を包括したリボソームであることを特徴とする。

【0018】

また、本発明の外来物質の導入方法の好ましい態様としては、小粒子が、外来物質を固定化したビーズであることを特徴とする。

【0019】

また、本発明の外来物質の導入方法の好ましい態様としては、外来物質の固定化を、硬化原料を水中に有している油中水型エマルジョンに、少なくとも外来物質及び硬化剤を含む水溶液を添加し、硬化反応物を形成することにより行うことを特徴とする。

【0020】

また、本発明の外来物質の導入方法の好ましい態様としては、前記硬化原料が、アルギン酸ナトリウムであり、前記硬化剤が塩化カルシウムであり、前記硬化反応物がアルギン酸カルシウムであることを特徴とする。

【0021】

また、本発明の外来物質の導入方法の好ましい態様としては、レーザーが、YAGレーザー、エキシマレーザー、Arイオンレーザー、窒素レーザー、窒素励起レーザーからなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする。

【0022】

また、本発明の外来物質の導入方法の好ましい態様としては、外来物質が、遺伝物質、タンパク質、オルガネラ、生理活性物質、指示薬からなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする。

【0023】

また、本発明の外来物質の導入方法の好ましい態様としては、遺伝物質が、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、プラスミド、染色体、人工染色体、オルガネラDNA、及び核酸アナログからなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴

とする。

【0024】

また、本発明の外來物質の導入方法の好ましい態様としては、生細胞にレーザー光を照射し、前記生細胞の細胞膜及び/又は細胞壁の一部に穿孔を設け、前記穿孔からマイクロインジェクターを用いて前記生細胞内へ外來物質を導入することを特徴とする。

【0025】

また、本発明の外來物質の導入方法の好ましい態様としては、生細胞にレーザー光を照射し、前記生細胞の細胞膜及び/又は細胞壁の一部に穿孔を設け、前記穿孔周辺上に外來物質を包括したリボソームを置き、前記生細胞内へ外來物質を導入することを特徴とする。

【0026】

また、本発明のスフェロプラスト化又はプロトプラスト化する方法は、植物生体組織中の1個又は複数個の細胞にレーザーを照射し、当該照射細胞の細胞壁の一部を除去した後、該照射部位周辺に加水分解酵素を滴下し、照射部位周辺の細胞壁のみを選択的に除去し、スフェロプラスト化又はプロトプラスト化することを特徴とする。

【0027】

また、本発明のスフェロプラスト又はプロトプラスト化する方法の好ましい態様としては、植物生体組織が、葉、根、茎、茎頂、根端、胚細胞、種子、花粉、カルス、懸濁細胞、不定胚、及び毛状根からなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする。

【0028】

また、本発明の形質転換体は、本発明の外來遺伝物質の導入方法を用いて遺伝物質を導入したことを特徴とする。

【0029】

【発明の実施の形態】

本発明の外來物質の導入方法は、生細胞にレーザー光を照射し、前記生細胞の細胞壁及び/又は細胞膜の一部に設けた穿孔を利用するものである。即ち、本発

明の外来物質の導入方法は、1)前記穿孔周辺に外来物質を担持した小粒子を設置すること、2)前記穿孔からマイクロインジェクターを用いること、又は3)前記穿孔周辺上に外来物質を包括したリボソームを置き、前記リボソームを細胞膜と融合させること、の上記1)～3)のいずれかを用いて達成することができる。なお、本発明の対象となる生細胞としては、動物細胞、植物細胞、微生物等を挙げることができ、特に限定されない。

【0030】

まず、生細胞の細胞膜表面の一部に外来物質を担持した小粒子を置き、前記細胞膜表面の一部にレーザー光を照射することにより細胞膜に穿孔を設け、該穿孔を通じて外来物質を前記生細胞内へ導入する方法について説明する。

【0031】

本発明に用いるレーザーは、特に限定されない。レーザーは、極めて集光性に優れ、しかもレーザービームスポット以外の部分へは、熱影響がほとんど無いという点で優れている。レーザーとしては、例えば、YAGレーザー、エキシマレーザー、Arイオンレーザー、窒素レーザー、窒素励起レーザー等を挙げることができる。加工細胞の熱損傷が特に少なく、加工精度に優れ、照射エネルギー及び照射回数によって加工深度を容易に制御可能であるという観点から、好ましくは、エキシマレーザーである。

【0032】

生細胞へのレーザーの照射条件については、生細胞の種類によって適宜変更することができる。

レーザースポット径としては、例えば、1～100 μm の範囲である。好ましくは、5～30 μm の範囲である。かかる範囲としたのは、照射後の外来物質の導入に十分な大きさであり、かつ、細胞へのダメージが少ないからである。

【0033】

レーザーのエネルギー密度についても特に限定されないが、1～100 mJ/cm^2 の範囲である。好ましくは、30～80 mJ/cm^2 の範囲である。かかる範囲としたのは、1 mJ/cm^2 未満では、細胞壁を十分加工できないからであり、100 mJ/cm^2 を超えると、レーザーが細胞膜を貫通し、細胞にダメージが大きいためである。

【 0 0 3 4 】

レーザーの出力としては、 $1 \sim 1000 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ の範囲である。好ましくは、 $10 \sim 100 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ の範囲である。

レーザー光の照射によって、得られる穿孔の大きさは、導入する外来物質の大きさにもより特に限定されない。例えば、穿孔の大きさは、 $1 \sim 1000 \mu \text{m}^2$ 程度である。オルガネラなどを比較的大きい物質を導入する場合には、 $100 \sim 1000 \mu \text{m}^2$ 程度である。プラスミドなど比較的小さい物質を導入する場合には、 $1 \sim 100 \mu \text{m}^2$ 程度である。

上述の条件で、レーザー光を照射し、生細胞の細胞膜及び／又は細胞壁の一部に穿孔を設けることができる。

【 0 0 3 5 】

本発明においては、細胞膜表面の一部に外来物質を担持した小粒子を置く。動物細胞の細胞膜は、細胞の外周に存在し、容易に露出させることができる。一方、植物細胞の細胞膜は、細胞壁の内側に存在するため、細胞壁を除去する必要がある。細胞壁の除去は、常法のプロトプラスト化法を用いて、行うことができる。また、後述するような本発明のスフェロプラスト化又はプロトプラスト化方法を用いて、細胞壁の全部又は一部を除去することができる。レーザーの照射によって、細胞壁の全部又は一部除去を自由に設定変更することができ、特に局所的に細胞壁に孔を開けることができるので、周辺の細胞には、多数の健全な細胞を維持させつつ、所望の細胞にのみ的確に、外来物質を導入でき、ひいては、外来物質を導入した特定の細胞のみを良好に、形質転換、増殖させることが可能となる。

【 0 0 3 6 】

小粒子の設置方法としては、例えば、マイクロマニピュレータや、光ピンセット法等を用いる方法を挙げることができる。

【 0 0 3 7 】

ここで、外来物質を担持した小粒子の作成方法について説明する。小粒子とは、外来物質を担持(包括、吸着、付着等)可能であり細胞内へ導入された後、担持していた外来物質を放出することができる微粒子をいう。このような微粒子とし

ては、アルギン酸ビーズ、リボソーム、金粒子や、タングステン粒子などの金属粒子、シリコンカーバイトウイスカー、ウイルスの外套タンパク質などを挙げるができる。

【0038】

以下では、小粒子として、ビーズを例にとって説明するが、本発明はこれに限定される意図ではない。

ビーズの材料としては、特に限定されないが、例えば、イオン種によりゲル化を制御することが可能なアルギン酸一価塩、 κ -カラギーナン等の水溶液、寒天、ゼランガム等の水溶性ゲル化多糖類を挙げるができる。

【0039】

外来物質の担持は、硬化原料を水中に有している油中水型エマルジョンに、少なくとも外来物質及び硬化剤を含む水溶液を添加し、硬化反応物を形成することにより行うことができる。硬化原料として、アルギン酸ナトリウム等を挙げることができる。硬化剤としては、塩化カルシウム等を挙げるができる。この場合、硬化反応物は、アルギン酸カルシウムである。なお、外来物質を操作性よく細胞内に導入するために光ピンセット法を用いる場合、アルギン酸カルシウムが、光ピンセット法に要求される以下の条件(1)～(9)を具備するという観点からも、アルギン酸カルシウムを用いる利点がある。

【0040】

(1) 固化する前にDNAなどの外来物質を溶解あるいは懸濁する溶液として存在し、固化後は水溶液中である程度安定な固体あるいはゲル状態として存在する素材であること。

(2) 光ピンセットによる操作を可能とするために、光を通過させ、かつ水よりも高い屈折率を有すること。

(3) 水と同じかそれよりもやや高い比重を有すること。

(4) 操作手順が容易であること。

(5) 通常の材料及び装置を用いて作製可能であること。

(6) 細胞の生育を阻害しないこと。

(7) ビーズの作製過程及び固化後、DNAなどの外来物質の内部で安定に保持さ

れること。

(8) 細胞内に導入するために、直径 $10\mu\text{m}$ 以下に加工することが可能であること。

(9) 細胞内では、外来物質を放出すること。

【0041】

なお、上述の(1)～(9)の条件を満たすものとしては、アルギン酸カルシウム以外にリボソーム、ウイルスの外套タンパク質等を挙げることができる。

上述の油中水型エマルジョンは、例えば、アルギン酸一価塩等の水溶液を、水と混和しない有機溶媒でビーズ内に導入させた外来物質に加えて超音波処理などにより懸濁して得られる。得られた油中水型エマルジョン中に、二価以上のカチオンを含む水溶液などに外来物質を含む溶液を加えて、混和してゲル化する。これによって、ビーズ内部及び表面に外来物質を包括する粒子径 $0.01\sim 10\mu\text{m}$ のビーズを形成することができる。なお、ビーズの形状は特に限定されないが好ましくは、球状である。

【0042】

本発明に用いるビーズとしては、好ましくは、アルギン酸カルシウムのビーズである。アルギン酸カルシウムのビーズを使用するのは、上述の理由の他にアルギン酸が2価のカルシウムイオンにより、ゲル化するためである。該ビーズは、アルギン酸溶液を有機溶媒／水のエマルジョン系で乳化後、塩化カルシウムと混和して両者を攪拌して得ることができる。乳化に用いる有機溶媒としては、特に限定されないが、例えば、イソアミルアルコール、ブタノールなどを挙げることができる。

【0043】

また、アルギン酸溶液をセルソーターを利用して微小な液滴とし、塩化カルシウム溶液に滴下してビーズを作成することもできる。

0.5%～3%のアルギン酸ナトリウム水溶液を約50mMの塩化カルシウム水溶液に滴下すると、半透明で水より比重が高いゲルを調製することができる。好ましくは、アルギン酸ナトリウム水溶液の濃度は0.5%～3%であり、塩化カルシウム濃度は、50mM～1000mMである。かかる範囲としたのは、アルギン酸ナトリウム水溶

液の濃度が0.25%以下、又は塩カルシウム濃度が25mM以下の場合には、アルギン酸ナトリウムがゲル化しないおそれがあるためである。また、アルギン酸ナトリウム水溶液の濃度が3%以上では、エマルジョン化の際に液滴のサイズが大きくなる傾向がある。実用的なサイズ(10 μ m \sim 0.1 μ m)のビーズを作製するには、好ましくは、アルギン酸ナトリウム水溶液の濃度を0.5 \sim 1.5%、塩化カルシウム濃度50 \sim 200mMとする。

【0044】

また、10mMの塩化カルシウム水溶液に懸濁し、例えば、孔径5 μ mのナイロンメッシュにのせて500rpm、5分間の遠心により濾過して5 μ m以上のサイズのビーズを除去すれば、より小さいビーズを作製することが可能となる。

【0045】

ビーズの保存は、10mMの塩化カルシウム中で行うのが好ましい。なぜなら、二価カチオンをキレート化するEDTA、EGTAを含む溶液や高濃度の1価カチオンを含む溶液中では、速やかにソル化するので、それを避けるためである。

【0046】

また、カルシウム濃度を1M未満とするのが好ましい。1M以上であるとビーズ同士が凝集し易くなり再懸濁が困難になるおそれがあるためである。なお回収のために遠心を行う場合、7000rpm以上で行うと凝集し再懸濁が困難になるおそれがある。

【0047】

このように、本発明においては、小粒子を通じて、外来物質を生細胞内へ導入することができる。導入できる外来物質としては、遺伝物質、タンパク質、オルガネラ、生理活性物質、指示薬等からなる群から選択される少なくとも1種を挙げることができる。

【0048】

遺伝物質としては、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、プラスミド、染色体、人工染色体、オルガネラDNAからなる群から選択される少なくとも1種を挙げることができる。タンパク質としては、酵素、機能性タンパク、ホルモン等を、生理活性物質としては、有機低分子、ポリペプチド、無機物質、糖類等を、それぞれ挙

げることができる。

【0049】

外来物質を担持した小粒子が、生細胞内へ取込まれる過程について説明すると以下のようである。

レーザー照射によって細胞膜には一定期間穿孔を設けることができる。当該穿孔を通じて、小粒子が細胞内に流入させることができる。小粒子を細胞に取込んだ後、前記穿孔はふさがり元の細胞膜の状態となる。実際には、レーザー照射によって、一瞬穿孔が空くとほぼ同時に小粒子が細胞内へ流入する。

【0050】

なお、ビーズの大きさが適用である場合、エンドサイトーシスによって、植物細胞内へ外来物質を含有する小粒子が取込まれることも可能である。

取込まれた小粒子は、該植物細胞内で含有する外来物質を放出する。取込まれやすいビーズの大きさは、好ましくは、粒径 $0.01\sim 1\mu\text{m}$ である。

【0051】

生細胞が、ヒト、チャイニーズハムスター等の動物培養細胞の場合、該動物培養細胞とビーズとを混和することにより、小粒子がファゴサイトーシスにより細胞内に取込まれて、細胞内において、外来物質を放出する。取込まれやすいビーズの大きさは、好ましくは、粒径 $0.1\sim 0.5\mu\text{m}$ である。

【0052】

生細胞が、酵母の場合、外来物質を含有するビーズとスフェロプラスト化した酵母とを混和することで、該小粒子がエンドサイトーシスにより酵母内に取込まれる。取込まれやすいビーズの大きさは、好ましくは、粒径 $0.01\sim 1\mu\text{m}$ である。

【0053】

次に、生細胞にレーザー光を照射し、前記生細胞の細胞膜及び/又は細胞壁の一部に穿孔を設け、前記穿孔周辺からマイクロインジェクターを用いて前記生細胞内へ外来物質を導入する場合について説明する。

【0054】

レーザーの種類、レーザーの照射条件、レーザーのスポット径等のレーザーの諸条件については、上述した小粒子を用いる場合のものを、マイクロインジェクタ

ーを用いる方法においても適用することができる。

【0055】

また、導入し得る外来物質についても、上述した小粒子を用いる場合に掲げたものを用いることができる。

本発明において、穿孔周辺から外来物質を生細胞内に導入する場合、直接外来物質を導入しても良く、外来物質を含有する上述の小粒子を介して生細胞内へ導入しても良い。

【0056】

小粒子を介して導入する場合、小粒子の作成方法、小粒子の条件等については、上述のものを適用することができる。小粒子をマイクロインジェクターにより導入すれば、外来物質が人工染色体等のように物理的に強度が弱い場合、小粒子に包括することによって外来物質を保護しながら導入することが可能となる。

【0057】

次に、生細胞にレーザー光を照射し、前記生細胞の細胞膜及び/又は細胞壁の一部に穿孔を設け、前記穿孔周辺上に外来物質を包括したリボソームを置き、前記生細胞内へ外来物質を導入する方法について説明する。

【0058】

通常のリボソーム法によれば、効率が悪く、操作が複雑となるが、本発明の外来物質の導入方法によれば、レーザー光による穿孔を設けているので、かかる欠点を克服することができる。

【0059】

リボソームの設置には、リボソームを含む溶液をピペットマン、又はガラスキャピラリー、マイクロミニチュレーターなどを用いて滴下して行うことができる。リボソームを含む溶液としては、ポリエチレングリコール、マンニトール、塩化カルシウム等を含む溶液を挙げることができる。ポリエチレングリコール、塩化カルシウムは、リボソームと細胞膜との融合を促進させるために用いる。これらの濃度は、実際のサンプル細胞に依存して適宜調製する。マンニトールは、露出させた細胞の細胞膜と滴下する溶液の浸透圧を等張にするために用いる。マンニトールの濃度も実際のサンプル細胞に依存して適宜調製する。

【0060】

レーザーとリボソーム法と組合わせによって、以下の利点がある。通常のリボソーム法では、標的植物組織サンプル全体を酵素処理し、完全にプロトプラスト化した細胞を用いる必要がある。したがって、導入したい細胞を特定することはできない。

【0061】

ところが、本発明のレーザーとリボソーム法との組合わせによれば、①植物組織全体をプロトプラスト化する必要がないため、適用できる標的植物が広範囲に選べ、②物理的に弱い外来物質を確実に細胞内へ送り込むことも可能となる。

【0062】

なお、レーザーの種類、レーザーの照射条件、レーザーのスポット径等のレーザーの諸条件については、上述した小粒子を用いる場合のものを、レーザー光とリボソーム法との組み合わせによる本発明の方法において適用することができる。

【0063】

また、導入し得る外来物質についても、上述した小粒子を用いる場合に掲げたものを用いることができる。

【0064】

次に、本発明の植物生体組織をスフェロプラスト化又はプロトプラスト化する方法について説明する。本発明のスフェロプラスト化又はプロトプラスト化する方法は、植物生体組織中の1個又は複数個の細胞にレーザーを照射し、当該細胞の細胞壁の一部を除去した後、該植物生体組織に通常組織全体のプロトプラスト化に用いられる濃度より低い濃度の加水分解酵素を滴下して行う。

【0065】

植物生体組織としては、葉、根、茎、茎頂、根端、胚細胞、種子、花粉、カルス、懸濁細胞、不定胚、及び毛状根からなる群から選択される少なくとも1種を挙げることができる。

【0066】

本発明のスフェロプラスト化又はプロトプラスト化する方法においては、植物生体組織の少なくとも一部、より具体的には、1つの細胞の一部のみをプロトプ

ラスト化することが可能である。

【0067】

一般に、植物細胞は微生物や動物細胞と異なり、細胞を1つだけ培地に植えてもそれから増殖することは非常に稀である。なぜなら、細胞の増殖には周りに多数の健全な細胞が近接して存在する必要があるからである。この健全な細胞を一般にナース細胞と呼ぶ。すなわち、1つの細胞が増殖を開始するには、その1つの細胞に近接した他の細胞から栄養や成長に必要なホルモン等の補給を必要とする。

【0068】

したがって、通常のプロトプラスト調製法で得た細胞に、レーザーを用いて外来物質を導入しても、外来物質を導入した細胞を増殖させるのが困難であることが予想される。

ところが、本願発明の方法を用いることにより、1つの細胞の一部のみをプロトプラスト化することができるだけでなく、一部のみプロトプラスト化した細胞の周辺の細胞を健全な状態に保つことができる。したがって、本発明によれば、プロトプラスト化した細胞に、外来物質を導入した後も、高い確率で増殖させることが可能であり、特に外来物質が遺伝物質の場合には、形質転換の取得効率を上げることが期待できる。

【0069】

細胞壁分解酵素としては、例えば、セルラーゼ、ペクチナーゼ、マセロザイム、ドリセラゼ等を挙げることができる。細胞壁分解酵素の濃度としては、処理する植物細胞の種類、大きさ、生育時期等により特に限定されないが、レーザーで細胞壁の一部を除去してあるため、通常プロトプラスト化のために用いられる酵素濃度よりも低い0.1%~2%の範囲とすることができる。このことによって、レーザー処理された細胞周辺のみプロトプラスト化することができる。

【0070】

レーザーの種類、レーザーの照射条件、レーザーのスポット径等のレーザーの諸条件については、上述した小粒子を用いる場合で説明した条件を、本発明のスフェロプラスト化又はプロトプラスト化する方法に適用することができる。

【0071】

また、本発明の形質転換体は、上述の外來性遺伝子を導入する方法を用いて遺伝物質が導入されている。

【0072】

上述のように本発明の外來物質の導入方法は、他種または同種生物の核や染色体等のオルガネラ、あるいは人工的に作製した染色体等の巨大DNAを導入することが可能である。従って、これまで困難であった多重遺伝子の一括導入が可能であり、例えば、有用生理活性物質の生合成に関与する遺伝子群を一括して導入することにより、生育の早い生物で、有用生理活性物質を効率的に生産することなどが可能となる。

【0073】

また上述のように本発明の外來物質の導入方法は、植物ホルモンを植物に導入することができる。したがって、導入部付近の組織の成長を制御したい場合、本発明の外來物質の導入方法により、インドール酢酸、ナルタレン酢酸などのオーキシシン、ゼアチン、カイネチンなどのサイトカイニン、アブシジン酸、ジベレリン、ペプチド性ホルモンなどを、植物細胞に導入すれば、植物特定部位の成長を制御することができる。

【0074】

同様に、ファイトアレキシンなどの抗菌性物質、より具体的には、ピサチン、ファゼオリン、メジカルピン、リシチン、リシチノールなどを導入することで病原菌に感染しやすい組織の病害耐性を向上させたり、ウイルスやバクテリアフリーの完全無菌化細胞群を調製することができる。また、ファイトケラチン、グルタチオンなどの活性酸素除去剤を加えることで葉などの受光組織でのUVや光、根部での重金属などのストレスに対する耐性を向上させることもできる。

【0075】

【実施例】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明は、下記実施例に限定して解釈される意図ではない。

【0076】

実施例1

まず、レーザーの照射時に物質を細胞内に導入することを試みた。導入する物質としては、カルシウムイオンの指示薬であり、細胞内部への物質導入の確認に良く用いられるカルセインを採用した。導入する物質(カルセイン溶液)をタマネギ表皮細胞上に $0.1 \sim 1 \mu\text{l}$ 滴下する。滴下した溶液越しにタマネギ表皮細胞にエキシマレーザーにより、エネルギー密度 $30 \sim 90 \text{mJ}/\text{cm}^2$ で、 $10 \times 10 \sim 30 \times 30 \mu\text{m}$ の穿孔を開けた。タマネギ表皮細胞にレーザーにより穿孔が加工されると同時に、細胞内部へカルセインが導入されたことを蛍光顕微鏡により確認した。また、レーザー加工処理を施した細胞が、加工後24時間経過して生存していることをMTTにより確認した。

【0077】

さらに、エキシマレーザー照射による細胞壁の一部が除去された様子を、超深度形状解析顕微鏡を用いて3次元解析した。細胞壁は、タマネギ表皮細胞のものであり、レーザーの条件は、エネルギー密度 $60 \text{mJ}/\text{cm}^2$ 、照射範囲 $20 \times 20 \mu\text{m}$ 、波長 193nm であった。結果を図1に示す。図1は、レーザーにより加工したタマネギ表皮細胞の細胞壁の細孔の形状を示す。図1により、タマネギ表皮細胞は、細胞が盛り上がっているが、レーザー加工により生じた細孔が、はっきりと確認できる(図1(a))。

【0078】

次に、実際に小粒子を用いて、生細胞内への外来物質の導入を試みた。外来物質として、シグマより販売されている蛍光色素のFLUORESCHEIN ISOTHIOCYANATE-D-EXTRAN(通称FITC-Dextran)を用いた。採用したFITC-Dextranの分子量は、特に限定されない。

【0079】

小粒子の作製

1%アルギン酸ナトリウム($100 \mu\text{l}$)とイソamilアルコール($900 \mu\text{l}$)を 1.5ml 1マイクロ遠心チューブに分注した。超音波破碎を15秒行う。FITCラベルしたデキストランを含む 100mM 塩化カルシウム溶液を添加し、小粒子を懸濁する。小粒子は、ナイロンメッシュ(ボアサイズ $10 \mu\text{m}$)を 2000rpm で5分間の遠心操作により

通過させる。再度ボアサイズ $5\mu\text{m}$ のメッシュを同様に遠心操作により通過させて、小粒子を得た。この小粒子を外来物質の導入に用いた。

【0080】

細胞内への導入

2日間水耕栽培したタマネギから表皮細胞を切り取り、MS固形培地に置床する。導入する細胞に、ArFエキシマレーザー光(193nm)を、照射面積 $100\mu\text{m}^2$ 、エネルギー密度 $40\text{mJ}/\text{cm}^2$ で照射し、一部細胞壁を除去した。この部位に上記のように作製したFITCデキストランを包括させた小粒子を懸濁した水溶液をマイクロマニピュレーターにて $0.1\mu\text{l}$ 程度滴下し、その上からさらにArFエキシマレーザー光(193nm)を、照射面積 $100\mu\text{m}^2$ 、エネルギー密度 $10\text{mJ}/\text{cm}^2$ で照射し小胞の導入を行った。

【0081】

以下の要領で、導入した小粒子の確認を行った。OLYMPUS BX50型正立顕微鏡に落射蛍光装置BX-FLAを取り付けた蛍光顕微鏡を用いて、色素分離用IB励起(U-M NIBA)フィルター下において、FITCの蛍光を観察し小粒子の細胞内への導入を確認した。蛍光観察した時の蛍光像を図2(a)に、明視野像を図2(b)に示す。この結果、生細胞の異常は見られず、健全であった。

【0082】

実施例2

次に、レーザーの照射後にマイクロインジェクション法を利用して物質を細胞内へ導入することを試みた。

【0083】

タマネギ表皮細胞にエキシマレーザーにより、エネルギー密度 $30\sim 90\text{mJ}/\text{cm}^2$ で、 $10\times 10\sim 30\times 30\mu\text{m}$ の穿孔を開けた。レーザー加工により作成した穿孔から、マイクロインジェクションを用いてカルセイン溶液を導入した。細胞内部にカルセイン溶液が導入されたことを蛍光顕微鏡により観察した。

【0084】

実施例3

MS培地に播種後、30日経過したタバコSR-1植物体の双葉を用いて、エキシマ

レーザーによってレーザー加工した。レーザーのエネルギー密度は、 $30 \sim 90 \text{ mJ/cm}^2$ 、 $10 \times 10 \sim 30 \times 30 \mu\text{m}$ の穿孔を開けた。レーザー加工により生じる穿孔に細胞壁消化酵素を滴下した。24時間後、穿孔付近の細胞壁が消化された葉肉のプロトプラスト細胞の単離を観察した。

【0085】

実施例4 リボソームの細胞内導入法

FITC-DEXTRAN

シグマより販売されているFLUORESCCEIN ISOTHIOCYANETE-DEXTRAN (通称FITC-Dextran) を用いた。採用したFITC-DEXTRANの分子量は、特に限定しない。

【0086】

リボソームの調製

L- α -Dioleoyl Phosphatidyl ethanolamine と

N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethyl-ammonium とを 5 mg/ml の濃度でそれぞれ、クロロホルムに溶解した。それぞれ $200 \mu\text{l}$ ずつ混合し、低温、減圧下でクロロホルム溶液を完全に蒸発させた。蒸発と同時に脂質薄膜が作製できた。この薄膜へ、FITC-Dextran含む試料溶液を $50 \mu\text{l}$ 添加し、脂質薄膜に5分間静置した。さらに、 $450 \mu\text{l}$ の緩衝液 $10 \text{ mM Tris-HCl pH} 5.8$ を添加し、15分静置した。ボルテックスにより薄膜脂質、試料溶液と緩衝液とを、攪拌操作により混合し、FITC-Dextranを内包したリボソームを作製した。

【0087】

細胞内への導入

2日間水耕栽培したタマネギから表皮細胞を切り取り、MS固形培地に置床する。タマネギ表皮細胞にエキシマレーザー光を照射し、表皮細胞を加工する。このときの照射範囲は、 100 から $400 \mu\text{m}^2$ で、エネルギー密度は、 $20 \sim 60 \text{ mJ/cm}^2$ とする。加工した表皮細胞上に作製したFITCデキストランを包括させたリボソームを懸濁した(6% ポリエチレングリコール及び 0.1 M マンニトールを含む)水溶液を滴下する。滴下した水溶液上をエキシマレーザー光を照射する。

【0088】

導入リボソームの観察

OLYMPUS BX50型正立顕微鏡に落射蛍光措置BX-FLAを取り付けた蛍光顕微鏡を用いて、色素分離用IB励起（U-MNIBA）フィルター下において、FITCの蛍光を観察し小粒子導入を行った。

【0089】

【発明の効果】

本発明の外来物質の導入方法によれば、物質導入及び遺伝子導入による形質転換植物の作出において、特定の1つの細胞を標的細胞として用いることができるという有利な効果を奏する。

【0090】

本発明の外来物質の導入方法によれば、レーザー照射加工する標的植物種は、植物病原菌を用いる場合と異なり限定されないことから、汎用性が高いという有利な効果を奏する。

【0091】

本発明の外来物質の導入方法によれば、核や染色体などサイズの大きい外来物質の導入が可能となるという有利な効果を奏する。

【0092】

本発明の外来物質の導入方法によれば、複数種類の外来物質を同時に導入可能となるという有利な効果を奏する。

【0093】

本発明の外来物質の導入方法によれば、物理強度の弱い外来物質の安定な導入が可能となるという有利な効果を奏する。

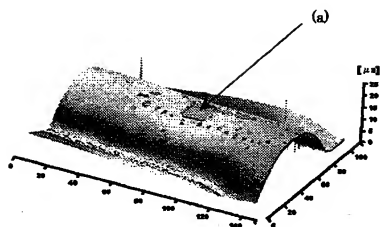
【図面の簡単な説明】

【図1】 レーザー照射による細胞壁を一部除去した様子を示す。

【図2】 (a) は、蛍光観察した時の蛍光像を示す。(b) は、明視野像を示す。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



(a)



(b)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 レーザー光の持つ高い加工特性を利用して、植物細胞壁を構成する生体高分子の化学結合を切断し、外来物質を導入する方法を提供することである。

【解決手段】 本発明の外来物質の導入方法は、生細胞の細胞表面の一部に外来物質を担持した小粒子を置き、該細胞表面の一部にレーザー光を照射することにより細胞壁及び／又は細胞膜に穿孔を設けると同時に外来物質を前記生細胞内へ導入することを特徴とする。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2000-392167
受付番号	50001667909
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成 12 年 12 月 26 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	391016945
【住所又は居所】	大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号
【氏名又は名称】	大阪大学長

【代理人】

【識別番号】	100072051
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関 3-2-4 霞山ビル 7 階
【氏名又は名称】	杉村 興作

【選任した代理人】

【識別番号】	100059258
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関 3-2-4 霞山ビル 7 階
【氏名又は名称】	杉村 暁秀

特2000-392167

出願人履歴情報

識別番号 [391016945]

1. 変更年月日	1991年 1月31日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府吹田市山田丘1番1号
氏 名	大阪大学長